PCI モードのトリプル四重極 GC/MS を用いたワイン中の 2-メトキシ-3-イソブチルピラジン (MIBP または IBMP) の高感度検出

技術概要

食品および香料

著者

Stephan Baumann
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd
Santa Clara CA 95051
USA

概要

Pressure Controlled Tee (PCT) を使用した PCI モードの Agilent 7890A/7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS を用い、ワイン中の 2 pptの2-メトキシ-3-イソブチルピラジンを検出および定量するためのメソッドを開発しました。

はじめに

多くの種類のワインには、しきい値が非常に低い芳香物質である 3-アルキル-2-メトキシピラジンが含まれています。これらは高濃度で出現し、ソーヴィニヨンブラン、セミヨン、およびカベルネソーヴィニヨンの特徴的な芳香に寄与しています。この化合物群の最も重要な構成要素の 1 つは、2-メチル-3-イソブチルピラジンです (MIBP または IBMP とも呼ばれます)。これはピーマンに含まれる物質で、ワインに野菜のピーマンのような香りを添えています。MIBP の嗅覚しきい値は白ワインで 1 ng/L と最も低く、最適濃度は 8〜15 ng/L と非常に低い範囲です。30 ng/L を超える濃度では悪臭が発生します。MIBP は数種のテントウムシのフェロモンとしても働き、これらの昆虫が原料のブドウに混入すると、高濃度のため味の悪いワインができます。

ワイン中の MIBP の検出はヘッドスペース固相マイクロ抽出 (HS-SPME) GC/MS 分析で行われ、検出下限 (LOD) 8.6 ng/L、定量下限 (LOQ) 33 ng/L の電子イオン化 (EI) による HS-SPME GC/MS/MS メソッドが最近報告されました [1]。この技術概要では、検出の感度を大幅に向上した Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS を使用したメソッドについて説明します。このメソッドでは、ポジティブ化学イオン化 (PCI) と GC バックフラッシュを利用して、サンプル抽出手順を変更せずに 2 ng/L (2 ppt) のレベルで検出できます。

Agilent Technologies

実験

標準品と試薬

使用した標準品と試薬を表 1 に示します。10,000 µg/ml の濃度の MIBP およびアイソトープ標識 MIBP の 10 % エチルアルコール原液は冷暗所に 4 ℃で保管し、希釈して検量線用の標準溶液として用いました。

表 1. 標準品と試薬

標準品	3-イソブチル 2-メトキシピラジン	Sigma-Aldrich	純度 99 %
試薬	無水アルコール	Malinckrodt	200 度数
	水	Millipore	5 ppb TOC
	塩化ナトリウム	Sigma-Aldrich	純度 99.5 %
	酒石酸	Sigma-Aldrich	純度 99 %

機器

実験は、スプリット/スプリットレスキャピラリ注入口を取り付けた Agilent 7890Aガスクロマトグラフ (GC) とトリプルアクシスディテクタを搭載した Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS を用いて行いました。スプリット/スプリットレス注入口には、長寿命セプタム (P/N 5183-4761) と、不活性化処理されたスプリットレスシングルテーパ注入ライナ (P/N 5181-3316) を使用しました。HSSPME の注入は手動の SPME ホルダ (Supelco、57330-U) を使用して行いました。機器条件を表 2 に示します。

表 2. ガスクロマトグラフと質量分析計の条件

GC 分析条件	
分析カラム	2 本の 15 m × 0.25 mm、0.25 µm Agilent J&W HP-5 ms UI カラム (P/N 190915-433UI)
注入口温度	250 °C
注入口圧力	9.5 psi
キャリアガス	ヘリウム、コンスタントフローモード、1.2 mL/min
スプリットレス	2 分後に 50 mL/min でパージ
オーブンプログラム	45 °C (2.25 分間保持)、8 °C/min で 130 °C まで
カラム線速度	39.8 cm/s
注入	SPME; 2 min; 250 °C
トランスファライン温度	250 °C
GC ポストラン条件	
バックフラッシュ装置	パージ付き Ultimate ユニオン (P/N G3186-60580) を圧力制御モジュール (P/N G3476-60501) で制御
バックフラッシュ条件	200 °C で -1.2 mL/min (2 分間)
MS 条件	
チューン	PCI オートチューン
デルタ EMV	800V
取り込みパラメータ	PCI; selected reaction monitoring (SRM)
反応ガス流量	メタン (20 %)
コリジョンガス流量	窒素 (1.5 mL/min)、ヘリウム (2.35 mL/min)
溶媒ディレイ	3.75 分
MS 温度	300 °C (イオン源); 150 °C (四重極)

1 メートルの Agilent J&W HP-5 ms Ultra Inert (UI) カラムをガードカラムとして使用し、注入口とカラムのメンテナンス頻度を軽減するためにバックフラッシュを採用しました。ガードカラムは、デッドボリュームが非常に低い Ultimate ユニオンを介して最初の分析カラムに接続しました。2 本の 15-m Agilent J&W HP-5ms UI 分析カラムはパージ付き Ultimate ユニオンとも呼ばれる PCT で接続しました [2-4]。ガードカラムは、SPME ファイバに吸着している汚染物質から分析カラムを保護し、分析カラムを酸化させることなく注入口を保守できるようにします。

サンプル前処理

すべてのサンプルは、20-mL ヘッドスペースバイアルで前処理しました。キャリブレーションサンプルは MIBP 原液からモデルワイン (12 % v/v エタノール中に 0.5 % w/v 酒石酸)で調整しました。スパイクサンプルは、ソーヴィニヨンブランおよびカベルネソーヴィニヨンワインで調整しました。キャリブレーションサンプルは MIBP で 0、5、20 および 100 ng/L に、スパイクサンプルはアイソトープ標識 MIBP で 80 ng/L に調整しました。2 グラムの塩化ナトリウムを添加して抽出効率を高めました。HS-SPME は、コンディショニング済みの 50/30 µm DVB/Carboxen/PDMS StableFlex SPME ファイバ (Supelco 部品番号 57329-U) を使用しました。静的 HP-SPME 抽出は室温で 30 分間行い、脱着は 250 °C で 2 分間行いました。

分析パラメータ

MIBP および内部標準の分析で使用したパラメータを表 3 に示します。

表 3. 分析パラメータ

		トリプル四重極 GC/MS		
化合物	**RT (分)**	**SRM**	**ドゥエルタイム (ms)**	**コリジョンエネルギー (EV)**
MIBP	11.5	167→94	60	35
		195→124	60	30
		195→106	60	35
アイソトープ標識 MIBP (内部標準)	11.5	170→127	20	30
		170→128	20	30
		170→100	20	30

結果

PCI により感度が向上

PCI を使用したトリプル四重極 GC/MS システムで開発したメソッドにより、複雑なマトリクス中での干渉を最小限に抑えた MIBP の超微量検出を行うことができます (図 1)。モデルワイン中の MIBP の検量線 (図 2) を使用して、カベルネソーヴィニヨン中の MIBPレベルは 2 ppt と決定されました (図 3)。MIBP はソーヴィニヨンブラン (図 4a) およびブランクモデルワイン (4b) では検出されませんでした。達成された高レベルの感度は、主にポジティブ化学イオン化 (PCI) の選択性によるものでした。

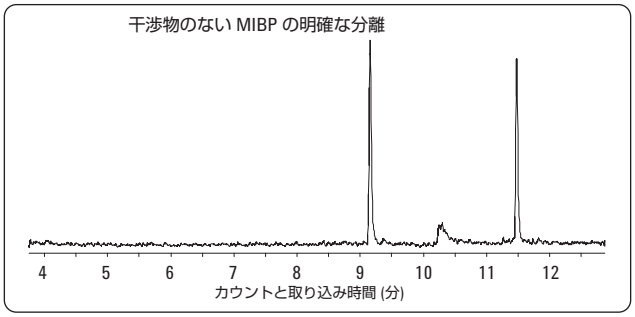


図 1. 5 ng/L のMIBP がスパイクされたカベルネソーヴィニヨンワインサンプル中の MIBP のトータルイオンカレントクロマトグラム (RTICC)。アイソトープ標識内部標準と MIBP はともに 11.5 分に溶出し、9.2 分と 10.4 分の干渉ピークから問題なく分離されました。

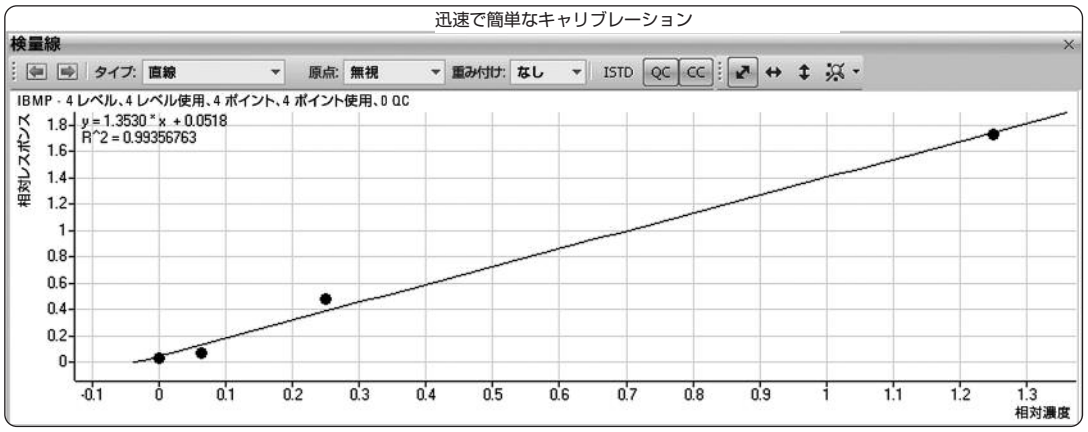


図 2. MIBP の検量線。モデルワイン中の 0、5、20 および 100 ng/L の MIBP で検量線を作成しました。

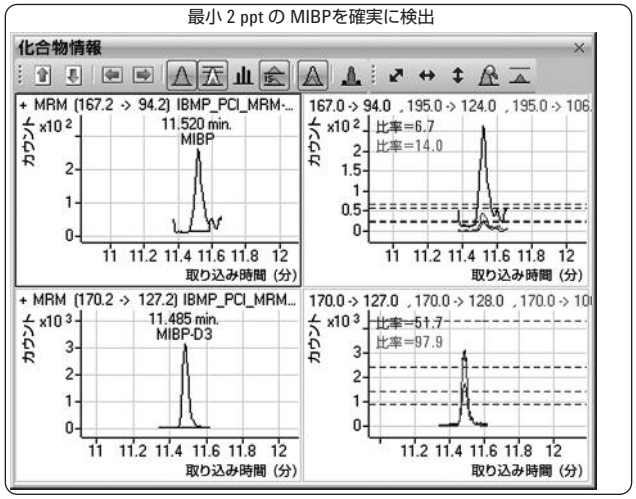
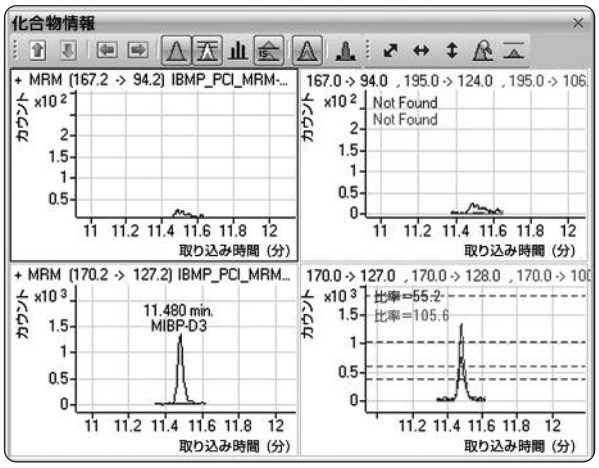
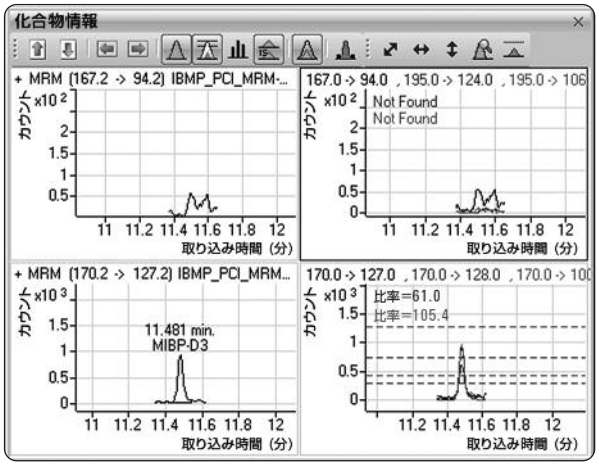


図 3. 図 2 の検量線を使用して定量した、カベルネソーヴィニヨンワイン中の 2 ng/L (2 ppt) のネイティブ (スパイクされていない) MIBP の検出。上のトレースは、目立った干渉物のない MIBP の定量トランジション (左) と2 つの定性トランジション (右) を示しています。定性トランジションのトレースには、2 つの定性トランジションの不確定バンドと定量トランジションのピーク面積に対する比率も示されています。下のトレースは、内部標準であるアイソトープ標識 MIBP の定量トランジションと定性トランジションを示しています。

化学干渉物を排除することで低いバックグラウンドと高い感度を実現



a.



b.

図 4. ソーヴィニヨンブランワイン (a) と MIBP を含まないモデルワイン (b) の分析。上のトレースは、目立った干渉物のない MIBP の定量トランジション (左) と2 つの定性トランジション (右) を示しています。どちらのサンプルにおいても MIBP は検出されませんでした。下のトレースは、内部標準であるアイソトープ標識 MIBP の定量トランジションと定性トランジションを示しています。定性トランジションのトレースには、2 つの定性トランジションの不確定バンドと定量トランジションのピーク面積に対する比率も示しています。

結論

新しい Agilent 7000 トリプル四重極 GC/MSを PCI モードでバックフラッシュとともに使用することにより、夾雑による干渉が最小化され、ワイン中の 2 ppt の MIBP が検出可能になります。

参考文献

1. R. Godelman, S. Limmert, T. Kuballa, “Implementation of head-space solid-phase-micro-extraction-GC-MS/MS methodology for determination of 3-alkyl-2- methoxypyrazines in wine”, Eur Food Res Technol 227, 449-461 (2008).
2. H. Prest, C. Foucault and Y. Aubut, Capillary Flow Technology for GC/MS: Efficacy of the Simple Tee Configuration for Robust Analysis Using Rapid Backflushing for Matrix Elimination, Agilent Technologies Publication 5989-9359EN.
3. H. Prest, 「GC/MSのキャピラリ・フロー・テクノロジー:シンプルな分岐デバイスによる高速マトリクスバックフラッシュ付き微量分析システム」、アジレント資料番号 5989-8664JAJP.
4. H. Prest, The Pressure Controlled Tee (PCT): Configurations, Installation and Use, Agilent Technical Document G1472-90001.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2009
Printed in Japan
November 12, 2009
5990-4935JAJP

Agilent Technologies